·论著·

青蒿琥酯调控 NLRP3/ASC/Caspase-1 信号通路减轻脑出血小鼠炎症并保护神经功能的作用研究

李媛[1,2]，木艳玲[1,2]，薛孟周[1,2*]

【摘要】 **背景** 炎症反应是脑出血（ICH）病情进展的主要因素。青蒿琥酯（ART）具有抗菌和抗炎的药理活性，ART 在脑内浓度较高，但对脑出血损伤的神经保护作用尚不清楚。**目的** 观察脑出血后 ART 对炎症反应的影响并探讨其机制。**方法** 2022 年 3 月—2023 年 2 月选取 108 只 8~10 周雄性 C57BL/6 小鼠，随机分为假手术组（Sham 组，n=36）、ICH 对照组（ICH+Vehicle 组，n=36）、ART 治疗组（ICH+ART 组，n=36），建立 ICH 模型，ICH+ART 组在造模后 2 h 腹腔注射 ART 溶液 150 mg·kg^{-1}·d^{-1}，ICH+Vehicle 组腹腔注射 5% 碳酸氢钠溶液，连续注射 3 d。观察小鼠行为学指标，HE 染色观察各组小鼠脑组织损伤情况，免疫组织化学染色检测白介素（IL）6、IL-1β、髓过氧化物酶（MPO）单位面积阳性细胞数，IBA1 免疫荧光染色观察小胶质细胞 / 巨噬细胞的激活情况，TUNEL/NeuN 免疫荧光双染色观察神经元死亡情况，蛋白质印迹法比较小鼠 MPO、IL-1β、肿瘤坏死因子 α（TNF-α）、NOD 样受体蛋白 3（NLRP3）、凋亡相关颗粒样蛋白（ASC）和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1（Caspase-1）水平。**结果** 3 组小鼠改良神经系统严重程度评分、右转弯的百分比比较，差异有统计学意义（P<0.05），其中 ICH+Vehicle 组高于 Sham 组，ICH+ART 组低于 ICH+Vehicle 组（P<0.05）。HE 染色结果示 Sham 组纹状体周围有少量血液，水肿可忽略不计，ICH+Vehicle 组脑组织严重损伤，细胞间隙增加、血管周围血肿、炎性细胞浸润增加；ICH+ART 组上述症状均有明显改善。3 组小鼠 IL-6、IL-1β、MPO 单位面积阳性细胞数比较，差异有统计学意义（P<0.05），其中 ICH+Vehicle 组 IL-6、IL-1β、MPO 阳性细胞数均高于 Sham 组，ICH+ART 组 IL-6、IL-1β、MPO 阳性细胞均低于 ICH+Vehicle 组（P<0.05）。3 组小鼠小胶质细胞 / 巨噬细胞激活数比较，差异有统计学意义（P<0.05），其中 ICH+Vehicle 组高于 Sham 组，ICH+ART 组低于 ICH+Vehicle 组（P<0.05）。3 组小鼠神经元死亡数量比较，差异有统计学意义（P<0.05），其中 ICH+Vehicle 组高于 Sham 组，ICH+ART 组低于 ICH+Vehicle 组（P<0.05）。3 组小鼠 MPO、IL-1β、TNF-α、NLRP3、ASC 和 Caspase-1 水平比较，差异有统计学意义（P<0.05），其中 ICH+Vehicle 组 MPO、IL-1β、TNF-α、NLRP3、ASC 和 Caspase-1 水平均高于 Sham 组，ICH+ART 组 MPO、IL-1β、TNF-α、NLRP3、ASC 和 Caspase-1 水平均低于 ICH+Vehicle 组（P<0.05）。**结论** ICH 后 ART 治疗可通过靶向调节 NLRP3/ASC/Caspase-1 信号通路减轻小鼠纹状体炎症反应，并减少小胶质细胞激活，最终减轻纹状体神经元凋亡并改善脑水肿。

【关键词】 脑出血；炎症；青蒿琥酯；NOD 样受体蛋白 3；半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1；小鼠

【中图分类号】 R 74 R 36 【文献标识码】 A DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0160

【引用本文】 李媛，木艳玲，薛孟周 . 青蒿琥酯调控 NLRP3/ASC/Caspase-1 信号通路减轻脑出血小鼠炎症并保护神经功能的作用研究[J]. 中国全科医学，2023.[Epub ahead of print]. DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0160.[www.chinagp.net]

LI Y，MU Y L，XUE M Z. Mechanism of artesunate regulating NLRP3/ASC/Caspase-1 signaling pathway to reduce inflammation and protect neurological function in mice with intracerebral hemorrhage[J]. Chinese General Practice，2023.[Epub ahead of print].

Mechanism of Artesunate Regulating NLRP3/ASC/Caspase-1 Signaling Pathway to Reduce Inflammation and Protect Neurological Function in Mice With Intracerebral Hemorrhage

LI Yuan[1,2]，*MU Yanling*[1,2]，*XUE Mengzhou*[1,2*]

1.Department of Cerebrovascular Diseases，the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University，Zhengzhou 450000，China

2.School of Medical Science，Zhengzhou University 450001，China

[*]Corresponding author：XUE Mengzhou，Professor/Doctoral supervisor；E-mail：xuemengzhou@zzu.edu.cn

---

基金项目：国家自然科学基金资助项目（8207052870）；国家自然科学基金重点国际（地区）合作研究项目（81520108011）；国家重点研发计划项目（2018YFC1312200）

1.45000 河南省郑州市，郑州大学第二附属医院脑血管疾病科 2.45000 河南省郑州市，郑州大学医学科学院

[*]通信作者：薛孟周，教授 / 博士生导师；E-mail：xuemengzhou@zzu.edu.cn

本文数字出版日期：2023-04-27

【Abstract】 **Background** The inflammatory response is a major factor in the progression of intracerebral hemorrhage (ICH). Artesunate (ART) has antibacterial and anti-inflammatory pharmacological activity with high concentrations in the brain, but its neuroprotective effect on cerebral hemorrhage injury remains unclear. **Objective** To observe the effect of ART on inflammatory response after intracerebral hemorrhage and explore its mechanism. **Methods** From March 2022 to February 2023, 108 male C57BL/6 mice aged 8 to 10 weeks were selected and randomly divided into the sham-operated group (Sham group, *n*=36), ICH control group (ICH+Vehicle group, *n*=36) and ART treatment group (ICH+ART group, *n*=36). ICH model was established. The mice in the ICH+ART group were intraperitoneally injected with 150 mg · kg^{-1} · d^{-1} 2 h after modeling, and the mice in the ICH+Vehicle group were intraperitoneally injected with 5% sodium bicarbonate solution for 3 consecutive days. The behavioral indicators of mice were observed. The brain tissue damage of mice in each group was observed by HE staining; the number of positive cells per unit area of interleukin (IL) 6, IL-1β and myeloperoxidase (MPO) were detected by immunohistochemical staining; the activation of microglia/macrophages was observed by IBA1 immunofluorescence staining. TUNEL/NeuN immunofluorescence double staining was performed to observe neuronal death. The levels of MPO, IL-1β, tumor necrosis factor α (TNF-α), Nod-like receptor protein 3 (NLRP3), apoptosis-related granuloid protein (ASC) and cysteine aspartic protease 1 (Caspase-1) were compared by western blotting. **Results** There were significant differences in the modified neurological severity scores and percentages of right turn of mice among the 3 groups ($P<0.05$), which were higher in the ICH+Vehicle group than the Sham group, and lower in the ICH+ART group than the ICH+Vehicle group ($P<0.05$). HE staining results showed that there was a small amount of blood around the striatum in the Sham group and negligible edema. In the ICH+Vehicle group, brain tissue was seriously damaged, with increased intercellular space, perivascular hematoma and inflammatory cell infiltration. All of the above symptoms were significantly improved in the ICH+ART group. There were significant differences in the numbers of IL-6, IL-1β and MPO positive cells per unit area among the three groups ($P<0.05$), and the numbers of IL-6, IL-1β and MPO positive cells in the ICH+Vehicle group were higher than the Sham group, the numbers of IL-6, IL-1β and MPO positive cells in the ICH+ART group were lower than the ICH+Vehicle group ($P<0.05$). There was significanct differences in the number of activated microglia/macrophages among the three groups ($P<0.05$), and the number of activated microglia/macrophages in the ICH+Vehicle group was higher than the Sham group, the number of activated microglia/macrophages in the ICH+ART group was lower than the ICH+Vehicle group ($P<0.05$). There was significant difference in the number of neuron death among the three groups ($P<0.05$), and the number of neuron death in the ICH+Vehicle group was higher than the Sham group, and lower in the ICH+ART group than the ICH+Vehicle group ($P<0.05$). There were significant differences in the levels of MPO, IL-1β, TNF-α, NLRP3, ASC and Caspase-1 among the 3 groups ($P<0.05$), the levels of MPO, IL-1β, TNF-α, NLRP3, ASC and Caspase-1 in the ICH+Vehicle group were higher than the Sham group, the levels of MPO, IL-1β, TNF-α, NLRP3, ASC and Caspase-1 in the ICH+ART group were lower than the ICH+Vehicle group ($P<0.05$). **Conclusion** ART therapy after ICH attenuates the inflammatory response of striatum and the activation of microglia in mice through targeted regulation of NLRP3/ASC/Caspase-1 signaling pathway, and ultimately reduces striatal neuronal apoptosis and improves brain edema.

【Key words】 Cerebral hemorrhage; Inflammation; Artesunate; NOD-like receptor 3; Caspase-1; Mouse

脑出血（ICH）是一种高危的脑血管疾病，占脑卒中的 15%，其特点是高发病率、致残率和死亡率。ICH 的全球发病率逐年上升，目前每年有 500 万人被诊断为 ICH，其中约 300 万人死亡，只有 12%~39% 的患者预后具有完善的神经功能[1]。ICH 的发病率增加与高血压有关，ICH 的本质是血管破裂，导致炎症反应和脑损伤，其病理生理学涉及原发性损伤和多个继发性炎症级联反应，如氧化应激[2]、各种细胞凋亡[3]和神经炎症[4]。一般认为，ICH 的主要损伤是由血源性成分如血红素、血清铁和凝血酶引起的局部炎症[5]，而 ICH 后 3~7 d，继发性脑损伤逐渐占主导地位，ICH 后的炎症级联反应最终导致大量神经元凋亡，并成为影响患者预后的主要因素[6]。然而，ICH 患者药物治疗的临床转化仍然不足。在临床治疗中，大多数 ICH 患者的原发性损伤是不可逆的。因此，ICH 的治疗主要集中在避免神经功能的继发性损伤。NOD 样受体蛋白 3（NLRP3）炎性小体的激活在 ICH 期间巨噬细胞的激活中起着重要作用[7]。抑制 NLRP3 炎症体相关蛋白可减轻肺损伤[8]、肝损伤[9]、心肌损伤[10]、肾损伤[11]等。青蒿素有抗寄生虫、抗病毒、抗癌、抗炎、抗氧化等广泛的药理活性，青蒿琥酯（ART）是青蒿素衍生物，具有水溶性特点，由于青蒿琥酯可透过血 - 脑屏障，在脑组织中维持较高浓度，青蒿琥酯已被证明在炎症相关疾病中发挥保护作用，特别是在中枢神经系统损伤中，包括创伤性脑损伤[12]、蛛网膜下腔出血[13]、缺血再灌注损伤[14]等。本研究通过小鼠胶原酶注射模拟 ICH 发病过程，研究青蒿琥

酯（ART）与NLRP3/含CARD结构域的凋亡相关颗粒样蛋白（ASC）/半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶1（Caspase-1）信号通路在ICH后的表达关系及小鼠最终神经功能恢复情况的关系，并探讨其中机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 研究时间 2022年3月—2023年2月。

1.1.2 实验动物 选取108只8~10周雄性C57BL/6小鼠，购于北京维通利华实验动物有限公司，许可证号〔（京）2021-0006〕，体质量为19~22 g。所有小鼠均饲养于SPF级动物实验中心（河南省医药科学研究院），保持25 ℃室温和适宜的湿度，且在标准的12 h明/暗周期的清洁开放环境中饲养，饲养期间小鼠自由摄取水和食物。本研究通过郑州大学伦理委员会批准（2023042）。

1.1.3 主要试剂与仪器 4%多聚甲醛固定液（北京索莱宝生命科技有限公司，货号：P1110）、Ⅶ型胶原酶（美国Sigma公司，货号：C0773）、ART（上海麦克林生化科技有限公司，货号：182824-33-5）、兔抗肿瘤坏死因子α（TNF-α）多克隆抗体（美国Abcam，货号：ab183218）、兔抗白介素（IL）1β多克隆抗体（美国Abcam，货号：an283818）、兔抗髓过氧化物酶（MPO）多克隆抗体（美国Abcam，货号：ab208670）、兔抗IL-6多克隆抗体（美国Abcam，货号：ab208113）、兔ASC多克隆抗体（美国Abcam，货号：ab283684）、兔抗NLRP3多克隆抗体（美国Abcam，货号：ab263899）、兔抗Caspase-1多克隆抗体（美国Abcam，货号：ab207802）、兔抗肌动蛋白（actin）多克隆抗体（美国Abcam，货号：ab8226）；兔抗小胶质标记物（IBA1）抗体（日本Wako，货号：019-19741）；山羊抗兔IgG（Cy3）预吸附二抗（美国Abcam，货号：ab6939）；山羊抗小鼠IgG（碧云天生物技术，货号：A0568）；HRP标记的山羊抗兔IgG（上海生工生物工程有限公司，货号D110058）；小鼠数显式脑立体定位仪（安徽正华生物仪器设备有限公司，型号：ZH-蓝星B/S型）；1 μL微量进样器（德国Hamilton公司，型号：7001KH）；正直光学显微镜（德国Zeiss公司，型号：LSM880）；激光共聚焦显微镜（日本奥林巴斯公司，型号：Olympus FV1000）。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组和用药 将小鼠随机分为假手术组（Sham组，*n*=36）、ICH对照组（ICH+Vehicle组，*n*=36）、ART治疗组（ICH+ART组，*n*=36）。

1.2.2 小鼠ICH模型制备 选择8~10周龄雄性SPF级C57BL/6小鼠，使用10%水合氯醛4 mL/kg麻醉，将其置于立体定向框架中，颅骨顶部前囟后0.2 mm，中线右旁开2 mm钻直径为0.6 mm的小孔，ICH对照组和ART治疗组以0.1 μL/min的速率将0.1 U/μL胶原酶Ⅶ 0.75 μL注射至基底节区，注射器固定10 min以防止回流。假手术组注射0.75 μL 0.9%氯化钠溶液。手术后小鼠保持温暖，直到完全康复。将60 mg ART溶于6 mL 5%碳酸氢钠溶液中，ICH+ART组在造模后2 h腹腔注射ART溶液150 mg·kg^{-1}·d^{-1}，ICH+Vehicle组腹腔注射5%碳酸氢钠溶液，连续注射3 d。

1.2.3 小鼠行为学观察与测定 术后3 d每组选取6只小鼠使用改良神经系统严重程度评分（mNSS）评估运动、感觉、反射和平衡功能，总分18分，得分越高，神经损伤越严重。术后3 d每组选取6只小鼠做转角测试评估感觉运动与姿势不对称性，正常小鼠向右侧或左侧转身的次数基本相等，ICH小鼠倾向于向病灶同侧侧转。将两块20 cm长的玻璃板组成大约30度的角落，当小鼠进入角落深处时，两边触须同时受到刺激，会出现向上向后转回去的行为，记录左转弯或右转弯，每只小鼠重复20次，两次测试至少间隔30 s，计算右转弯的百分比=右转次数/所有转次数×100%。

1.2.4 小鼠脑组织标本制备 术后3 d，每组选取6只小鼠，水合氯醛麻醉后经心注射20~40 mL PBS和4%多聚甲醛，灌注完毕后迅速断头取脑组织，浸泡在4%多聚甲醛中，常规石蜡包埋固定，切成5 μm厚度切片，用于HE染色、IBA1免疫荧光染色、IL-6、IL-1β和MPO免疫组化染色、NeuN/Tunel染色。

1.2.5 HE染色 将石蜡切片进行脱脂，并在室温下进行HE染色，光学显微镜观察各组小鼠脑组织损伤情况并摄片记录。

1.2.6 免疫组织化学染色 石蜡切片封闭前使用氧化物酶溶液（3% H_2O_2，10%甲醇，PBS稀释）孵育切片15 min，用兔抗IL-6抗体（1∶300）、兔抗IL-1β抗体（1∶500）、兔抗MPO抗体（1∶700）在4 ℃孵育过夜，切片在PBS中洗涤3次，然后加入辣根过氧化物酶（HRP）联合二抗山羊抗兔Cy3（1∶3 000）孵育1 h。所有切片均用二氨基联苯胺（DAB）试剂、苏木素浸泡，晾干后显微镜观察。在每个脑切片中检查4个显微镜视野，每只小鼠检查3个切片，计算单位面积下阳性细胞数。

1.2.7 免疫荧光染色 将石蜡切片脱蜡、抗原提取、封闭后，用兔抗IBA1单克隆抗体（1∶2 000）在4 ℃孵育过夜。用PBS冲洗3次后，在室温下加入山羊抗兔Cy3二抗（1∶3 000）1 h。在荧光显微镜下观察小胶质细胞/巨噬细胞的激活情况，用Image J/Fiji软件计数IBA1阳性细胞数。

1.2.8 TUNEL/NeuN免疫荧光双染色 石蜡切片脱蜡处理，将切片与抗NeuN抗体（11∶600）在4 ℃下孵育过夜，根据TUNEL细胞凋亡试剂盒配置溶液，在室温下用山

羊抗小鼠 IgG（1∶3 000）孵育 2 h，漂洗封片。在荧光显微镜上观察，对每个切片随机选择的 4 个高倍视野进行分析，TUNEL 和 NeuN 阳性细胞被计数为死亡神经元。

1.2.9 蛋白质印迹法（Western blot）蛋白定量分析 每组选取 5 只小鼠，术后 3 d 断头处死取脑，在冰上选取 ICH 血肿周围 1 mm 区域的脑组织，称重，用 RIPA 裂解液对组织在冰上进行匀浆，离心，取上清，经 Nanodrop 定量后按照 30 μg 制作样品并煮沸备用。电泳分离目的蛋白，转模封闭后，置于以下一抗在摇床上 4 ℃孵育过夜：兔抗 IL-1β 抗体（1∶1 000）、兔抗 MPO 抗体（1∶1 000）、兔抗 TNF-α 抗体（1∶2 000）、兔抗 NLRP3 抗体（1∶1 000）、兔抗 ASC 抗体（1∶1 000）、兔抗 Caspase-1 抗体（1∶1 000）、兔抗 Actin 抗体（1∶3 000）。漂洗后加入山羊抗兔 HRP（1∶1 000）室温孵育 2 h。孵育完成后使用 Bio-Rad 化学发光仪显影成像，利用 Image J/Fiji 分析信号的光密度（OD）。

1.3 统计学方法 使用 Prism 8 软件进行统计学分析，符合正态分布的计量资料以（$\bar{x} \pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析，采用 Tukey 多重检验进行组间两两比较；非正态分布的计量资料以 M（P_{25}，P_{75}）表示，多组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验，组内两两比较采用 MannWhitney U 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组小鼠行为学结果比较 3 组小鼠 mNSS 评分结果比较，差异有统计学意义（$P<0.05$），其中 ICH+Vehicle 组高于 Sham 组，ICH+ART 组低于 ICH+Vehicle 组（$P<0.05$）。3 组小鼠右转弯的百分比比较，差异有统计学意义（$P<0.05$），其中 ICH+Vehicle 组高于 Sham 组，ICH+ART 组低于 ICH+Vehicle 组（$P<0.05$），见表 1。

2.2 3 组小鼠脑组织 HE 染色结果 Sham 组纹状体周围有少量血液，水肿可忽略不计，ICH+Vehicle 组脑组织严重损伤，细胞间隙增加、血管周围血肿、炎性细胞浸润增加；ICH+ART 组上述症状均有明显改善，见图 1。

2.3 3 组小鼠免疫组织化学染色结果 阳性反应呈棕黄色颗粒，IL-6、IL-1β、MPO 阳性表达代表纹状体中局部炎症细胞浸润，MPO 阳性代表中性粒细胞激活。结果显示，3 组小鼠 IL-6、IL-1β、MPO 单位面积阳性细胞数比较，差异有统计学意义（$P<0.05$），其中 ICH+Vehicle 组 IL-6、IL-1β、MPO 阳性细胞数均高于 Sham 组，ICH+ART 组 IL-6、IL-1β、MPO 阳性细胞均低于 ICH+Vehicle 组（$P<0.05$），见图 2、表 2。

2.4 3 组小鼠 IBA1 免疫荧光染色结果 3 组小鼠小胶质细胞 / 巨噬细胞激活数比较，差异有统计学意义（$P<0.05$），其中 ICH+Vehicle 组高于 Sham 组，ICH+ART 组低于 ICH+Vehicle 组（$P<0.05$），见图 3、表 3。

表 1 3 组小鼠行为学结果比较

Table 1 Comparison of behavioral results among three groups of mice

分组	只数	mNSS 评分〔M（P_{25}，P_{75}），分〕	右转弯的百分比（%）
Sham 组	6	0.5（0，1.0）	49.44 ± 9.38
ICH+Vehicle 组	6	8.0（5.0，8.0）[a]	71.67 ± 12.95[a]
ICH+ART 组	6	3.0（3.0，4.0）[b]	53.33 ± 7.67[b]
H 值		15.059	24.192
P 值		<0.001	<0.001

注：[a] 表示与 Sham 组比较 $P<0.05$，[b] 表示与 ICH+Vehicle 组比较 $P<0.05$。

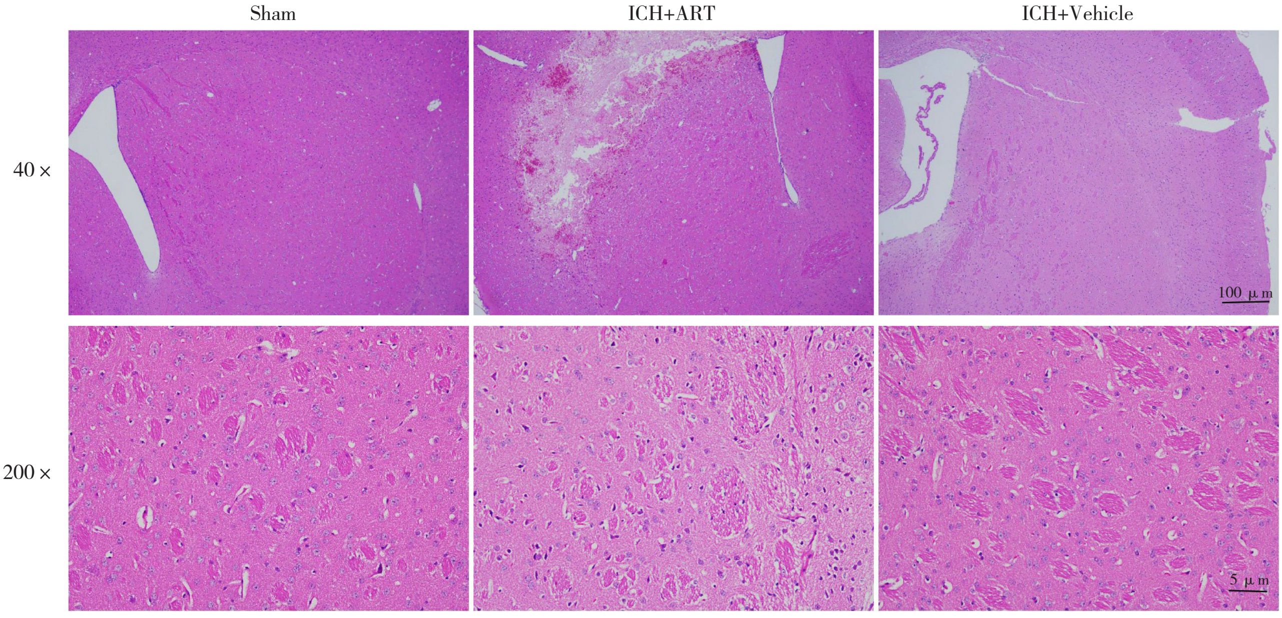


图 1 3 组小鼠脑组织 HE 染色结果（×200）

Figure 1 HE staining results of brain tissue among the 3 groups of mice

2.5 3组小鼠TUNEL/NeuN免疫荧光双染色结果 死亡细胞TUNEL染色呈绿色，神经元被染成红色，死亡神经元为红蓝叠加，3组小鼠神经元死亡数量比较，差异有统计学意义（P<0.05），其中ICH+Vehicle组高于Sham组，ICH+ART组低于ICH+Vehicle组（P<0.05），见图4、表4。

2.6 3组小鼠MPO、IL-1β、TNF-α、NLRP3、ASC和Caspase-1水平比较 3组小鼠MPO、IL-1β、TNF-α、NLRP3、ASC和Caspase-1水平比较，差异有统计学意义（P<0.05），其中ICH+Vehicle组MPO、IL-1β、TNF-α、NLRP3、ASC和Caspase-1水平均高于Sham组，ICH+ART组MPO、IL-1β、TNF-α、NLRP3、ASC和Caspase-1水平均低于ICH+Vehicle组（P<0.05），见图5、表5。

3 讨论

ART是青蒿素的水溶性衍生物，具有高效、低毒、耐受性好等特点。除了抗寄生虫作用，ART还具有抗炎、抗肿瘤和抗微生物作用[15]。其具有多种机制，如抑制炎性因子的产生、诱导铁依赖性细胞凋亡和抑制血管生成[16]。ART是一种多潜能药物，可以在中枢神经系统相关疾病治疗中发挥神经保护作用[12-14]，研究表明，ART可以通过直接保护疟疾感染小鼠的神经元，减少其凋亡[17]。此外，已有研究证明ART可以在大鼠创伤性脑损伤后保护神经元，并促进神经营养因子的释放，最终导致实验大鼠神经功能评分的提高[12]。上述研究表明，ART可能在ICH后神经功能的保护中发挥重要作用。

ICH是一种发病率和死亡率很高的疾病，经常会导致患者严重的神经功能缺陷，甚至死亡，给个人、家庭和社会带来沉重的负担。ICH后的炎症反应是导致疾病进展的主要因素。在这个过程中，小胶质细胞的募集和促炎细胞因子的释放发挥关键作用。此外，外周炎性细

表2 3组小鼠IL-6、IL-1β、MPO单位面积阳性细胞数比较（cells/mm^2）

Table 2 Comparison of the number of positive cells of IL-6，IL-1β and MPO per unit area among the three groups

分组	只数	MPO	IL-6	IL-1β
Sham组	6	6.06±2.56	24.11±2.91	17.06±4.37
ICH+Vehicle组	6	25.11±3.23^a	58.78±4.65^a	37.28±4.42^a
ICH+ART组	6	20.28±3.34^b	39.06±2.67^b	35.00±3.48^b
F值		188.317	439.284	130.575
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注：^{a}表示与Sham组比较P<0.05，^{b}表示与ICH+Vehicle组比较，P<0.05。

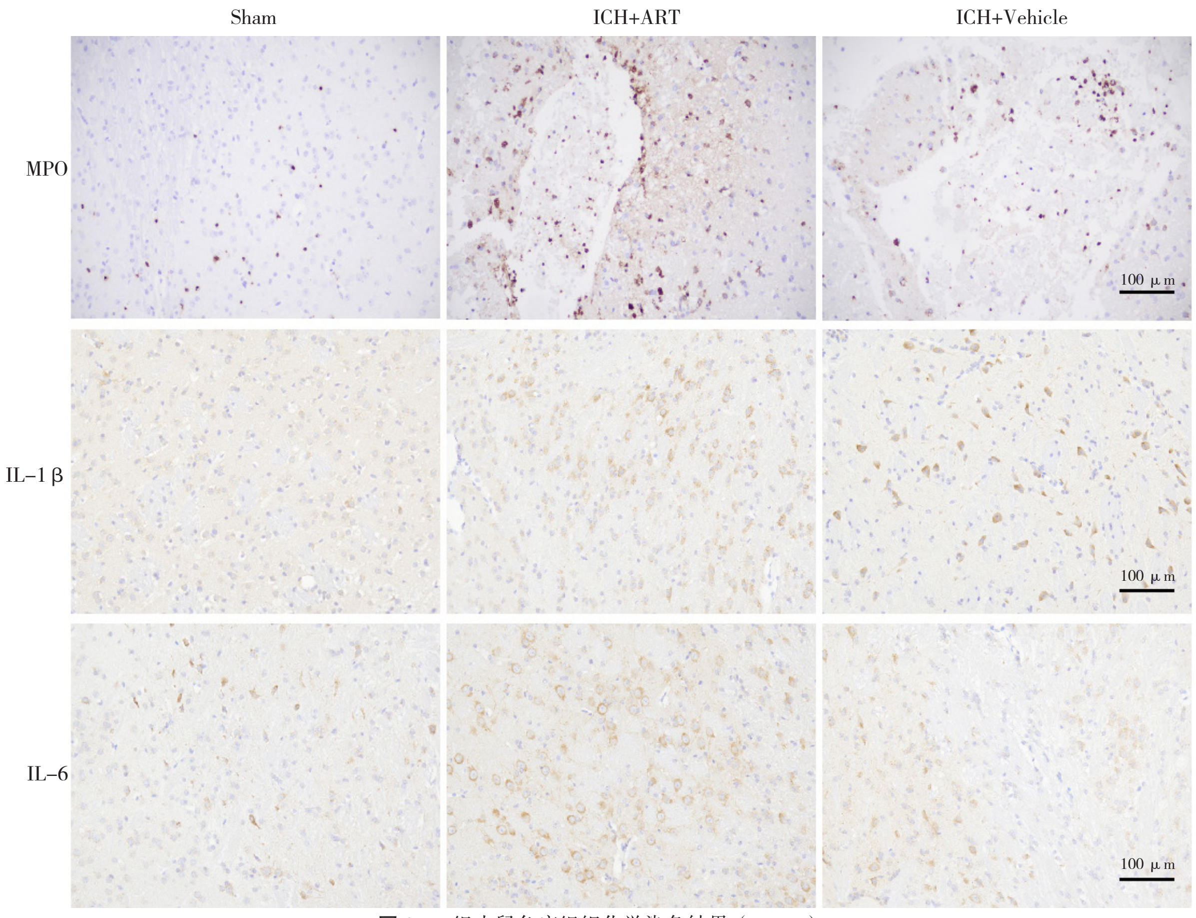


图2 3组小鼠免疫组织化学染色结果（×100）

Figure 2 Immunohistochemical staining results among the 3 groups of mice

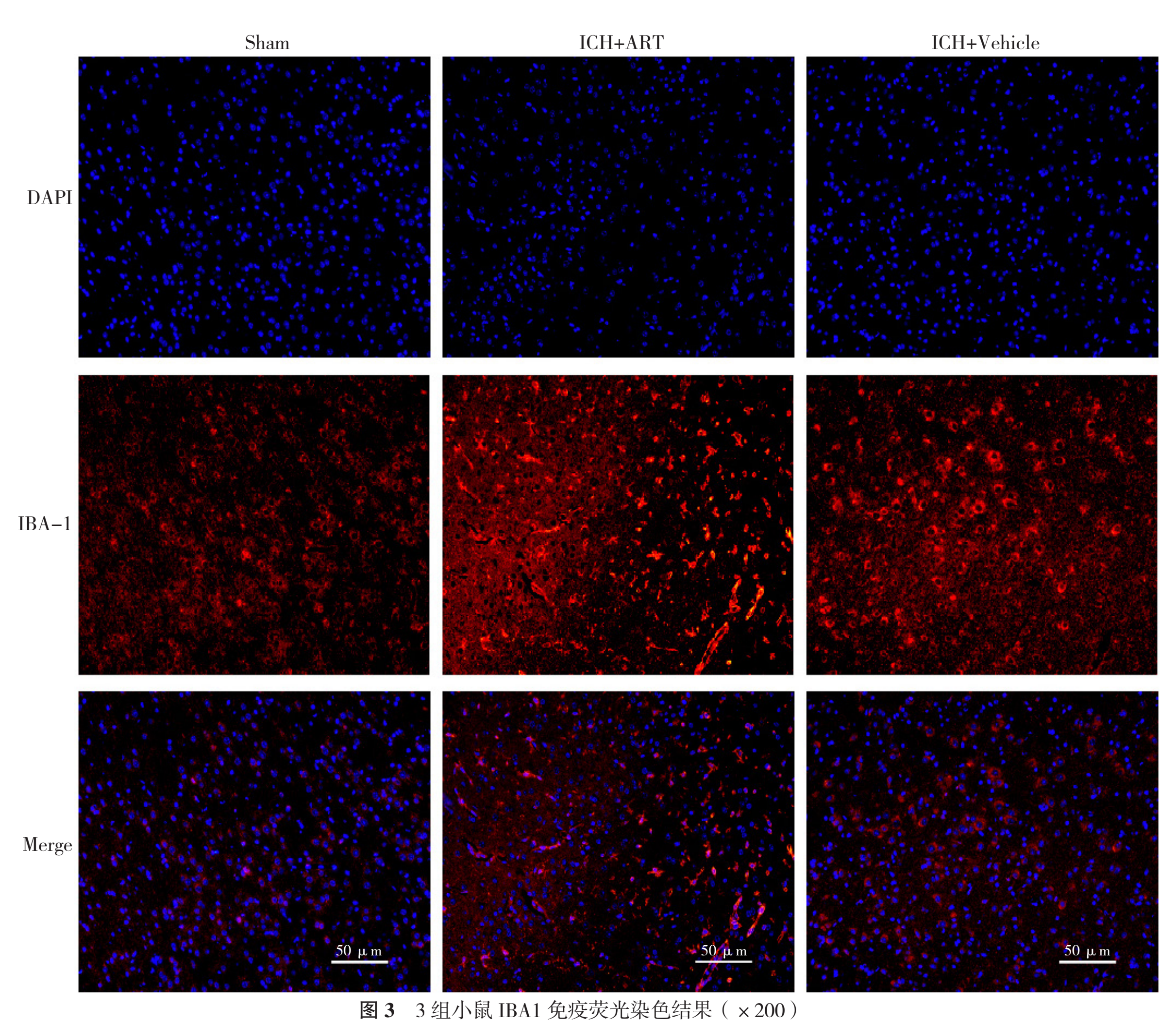


图 3 3 组小鼠 IBA1 免疫荧光染色结果（×200）

Figure 3 IBA1 immunofluorescence staining results among the 3 groups of mice

表 3 3 组小鼠小胶质细胞 / 巨噬细胞激活数比较（cells/mm²）

Table 3 Comparison of the numbers of activated microglia/macrophages among the 3 groups of mice

分组	只数	小胶质细胞 / 巨噬细胞激活数（cells/mm²）
Sham 组	6	29.44 ± 4.87
ICH+Vehicle 组	6	47.67 ± 6.63[a]
ICH+ART 组	6	35.72 ± 2.99[b]
F 值		24.192
P 值		<0.001

注：[b] 表示与 ICH+Vehicle 组比较，$P<0.05$。

表 4 3 组小鼠神经元死亡数量比较

Table 4 Comparison of neuronal death among the 3 groups of mice

分组	只数	神经元死亡数量（cells/mm²）
Sham 组	6	6.06 ± 2.80
ICH+Vehicle 组	6	20.44 ± 2.87[a]
ICH+ART 组	6	10.22 ± 4.11[b]
F 值		24.192
P 值		<0.001

注：[b] 表示与 ICH+Vehicle 组比较，$P<0.05$。

表 5 3 组小鼠 MPO、IL-1β、TNF-α、NLRP3、ASC 和 Caspase-1 水平比较

Table 5 Comparison of the levels of MPO，IL-1β，TNF-α，NLRP3，ASC and Caspase-1 among the 3 groups of mice

分组	只数	MPO	IL-1β	TNF-α	NLRP3	ASC	Caspase-1
Sham 组	5	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
ICH+Vehicle 组	5	4.28 ± 0.15[a]	3.30 ± 0.16[a]	4.30 ± 0.19[a]	2.46 ± 0.15[a]	2.12 ± 0.18[a]	4.10 ± 0.14[a]
ICH+ART 组	5	2.58 ± 0.19[b]	2.00 ± 0.16[b]	2.56 ± 0.11[b]	1.28 ± 0.08[b]	1.40 ± 0.07[b]	1.72 ± 0.15[b]
F 值		684.102	399.000	851.625	300.200	130.595	940.048
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：[a] 表示与 Sham 组比较，$P<0.05$，[b] 表示与 ICH+Vehicle 组比较，$P<0.05$。

胞，如白细胞，可以通过受损的血－脑脊液屏障进入中枢神经系统，进一步放大炎性损伤并使病情恶化[18]。因此，减少 ICH 后的炎症浸润和抑制炎症级联反应将可能是治疗 ICH 的新策略，具有重要的临床价值和社会意义。

先前的研究表明，ART 通过激活鞘氨醇 1 磷酸受

Sham ICH+ART ICH+Vehicle

TUNEL

NeuN

DAPI

Merge

50 μm 50 μm 50 μm

图 4　3 组小鼠 TUNEL/NeuN 免疫荧光双染色结果（×200）

Figure 4　TUNEL/NeuN immunofluorescence double staining results among the 3 groups of mice

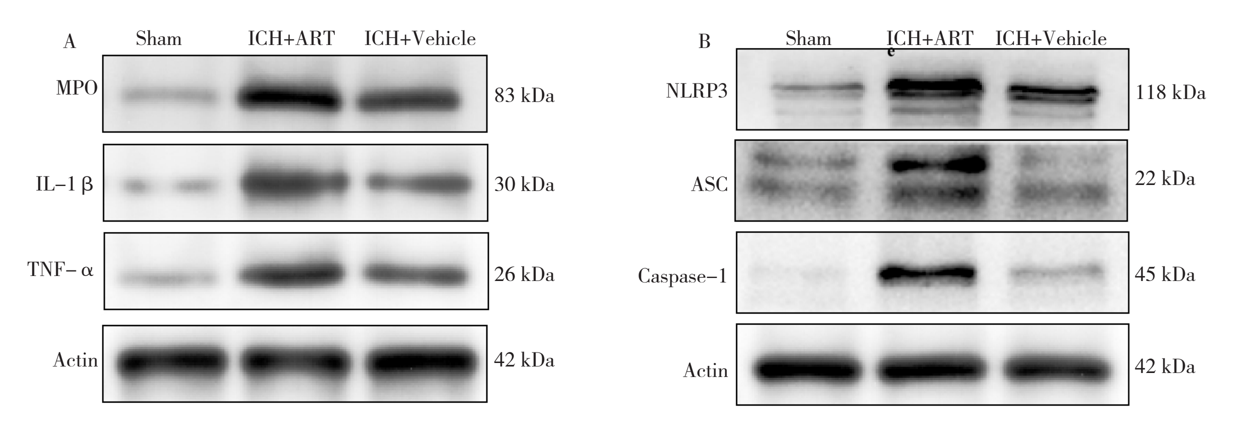


图 5　3 组小鼠 MPO、IL-1β、TNF-α、NLRP3、ASC 和 Caspase-1 蛋白表达情况

Figure 5　Expressions of MPO，IL-1β，TNF-α，NLRP3，ASC and Caspase-1 among the 3 groups of mice

体 1/ 磷脂酰肌醇 3 激酶（S1pR1/PI3K）信号通路保护蛛网膜下腔出血小鼠的血 – 脑脊液屏障[19]，体外研究表明 ART 通过 PI3K/ 蛋白激酶 B（Akt）信号通路促进神经干细胞增殖[20]。还有研究报道了 ART 在 ICH 后的保护作用，如活化核因子红细胞 2 相关因子 2（Nrf2）和活性氧（ROS）依赖性 p38 丝裂原活化蛋白激酶，以抑制氧化和炎症过程，防止 ICH 再灌注损伤[14]。据报道，ART 通过 Toll 样受体 4（TLR4）/ 核转录因子 – κ B（NF–κ B）途径对大鼠脑缺血再灌注损伤具有神经保护作用[21]。然而，尚未提及 ART 参与 NLRP3 炎性囊泡的研究。

NLRP3 炎症囊泡包括 NLRP3 受体蛋白、ASC 连接蛋白和 Caspase–1 效应蛋白，是天然免疫系统的重要组成部分。宿主来源的病原体相关分子模式（PAMP）或损伤相关分子模式，与模式识别受体（PRR）结合，激活 NLRP3，NLRP3 通过结合 ASC 来激活 Caspase–1 前体并水解，同时剪切 IL–1β 和 IL–18 的前体，最终释放 IL–1β 或 IL–18，加剧炎性反应[22]。此外，激活的 Caspase–1 还可以通过激活焦孔素 –D（GSDMD）介导细胞焦亡[23]。研究表明，Caspase–1 敲除后，ICH 小鼠的存活率明显增加[24]。一项研究还指出，青蒿琥酯在减少脂多糖（LPS）诱导的中枢神经系统炎症后可有效保护神经系统免受损伤，但该研究未检测 NLRP3/ASC/Caspase–1 的表达[25]。因此本研究假设 ART 参与 NLRP3 信号通路，以保护 ICH 后的神经功能。

鉴于 ICH 后发生血肿周围局部炎症级联反应对神经功能造成不可逆的原发性损害，本研究旨在研究 ART 对脑出血炎症级联反应，即继发性损害的减少。结果表明 ART 显著改善了实验动物 ICH 后的脑水肿，改善了动物转角实验和 mNSS–R 评分。本研究检测了 ART 治疗后小鼠体内 TNF–α、IL–1β 和 MPO 的表达，同时使用免疫荧光检测各组小鼠脑组织小胶质细胞的浸润，发现 ART 显著改善了 ICH 后 3 d 动物的神经炎症。为了研究上述现象发生的机制，本研究检测了各组动物中 NLRP3/ASC/Caspase–1 信号轴的表达水平，并发现 ICH 后使用 150 mg/kg 剂量的 ART 显著降低了 NLRP3/ASC/Caspase1 的表达水平，这也解释了 ICH+ART 组小鼠的脑组织局部炎症浸润的减少。

ICH 后炎症介导的神经元凋亡的意义是深远的。首先，神经元通过调节血 – 脑脊液屏障紧密链接的营养支持效应影响神经血管单位[26]。ICH 后神经血管单元的损伤导致局部蛋白质泄漏，形成纤维瘢痕，然后激活星形胶质细胞，形成局部胶质瘢痕，最终损害患者的神经功能[27]。有研究表明，ICH 早期神经元凋亡与患者皮质厚度减少、白质完整性丧失和海马萎缩的预后具有相关性[28]。因此，ICH 后早期抑制炎症浸润的作用是长期而深远的。总之，本研究表明，ART 通过阻断 NLRP3/ASC/Caspase–1 信号通路，在 ICH 后早期减轻局部炎症细胞激活，并最终减少神经元凋亡和脑水肿，以保护实验动物的神经功能。

作者贡献：李媛提出研究目标，负责研究的构思、设计与实施，撰写论文；李媛、木艳玲进行数据的收集与整理、统计学处理，图表的绘制与展示，论文的修订；薛孟周负责文章的质量控制与审查，监督管理，对文章整体负责。

本文无利益冲突。

参考文献

[1] BAKO A T，PAN A，POTTER T，et al. Contemporary trends in the nationwide incidence of primary intracerebral hemorrhage［J］. Stroke，2022，53（3）：e70–74. DOI：10.1161/strokeaha.121.037332.

[2] DENG M，LIU J，HE J，et al. SRC–3 deficiency exacerbates neurological deficits in a mouse model of intracerebral hemorrhage：role of oxidative stress［J］. Neurochem Res，2021，46（11）：2969–2978.DOI：10.1007/s11064-021-03399-7.

[3] WU Z，ZOU X，ZHU W，et al. Minocycline is effective in intracerebral hemorrhage by inhibition of apoptosis and autophagy［J］. J Neurol Sci，2016，371：88–95. DOI：10.1016/j.jns.2016.10.025.

[4] TSCHOE C，BUSHNELL C D，DUNCAN P W，et al. Neuroinflammation after intracerebral hemorrhage and potential therapeutic targets［J］. J Stroke，2020，22（1）：29–46. DOI：10.5853/jos.2019.02236.

[5] LEE K R，COLON G P，BETZ A L，et al. Edema from intracerebral hemorrhage：the role of thrombin［J］. J Neurosurg，1996，84（1）：91–96. DOI：10.3171/jns.1996.84.1.0091.

[6] DUAN X C，WANG W，FENG D X，et al. Roles of autophagy and endoplasmic reticulum stress in intracerebral hemorrhage–induced secondary brain injury in rats［J］. CNS Neurosci Ther，2017，23（7）：554–566. DOI：10.1111/cns.12703.

[7] XIAO L，ZHENG H，LI J，et al. Neuroinflammation mediated by NLRP3 inflammasome after intracerebral hemorrhage and potential therapeutic targets［J］. Mol Neurobiol，2020，57（12）：5130–5149. DOI：10.1007/s12035–020–02082–2.

[8] LI N，XIONG R，HE R，et al. Mangiferin mitigates lipopolysaccharide–induced lung injury by inhibiting NLRP3 inflammasome activation［J］. J Inflamm Res，2021，14：2289–2300. DOI：10.2147/jir.s304492.

[9] YANG J，LI J，GUO H，et al. An experimental study reveals the protective effect of autophagy against realgar–induced liver injury via suppressing ROS–mediated NLRP3 inflammasome pathway［J］. Int J Mol Sci，2022，23（10）：5697. DOI：10.3390/ijms23105697.［PubMed］

[10] WANG F，GAO Q，YANG J，et al. Artemisinin suppresses myocardial ischemia–reperfusion injury via NLRP3 inflammasome mechanism［J］. Mol Cell Biochem，2020，474（1/2）：171–180. DOI：10.1007/s11010–020–03842–3.

[11] YANG M, SHEN P, XU L, et al. Theacrine alleviates sepsis-induced acute kidney injury by repressing the activation of NLRP3/Caspase-1 inflammasome [J]. PeerJ, 2022, 10: e14109. DOI: 10.7717/peerj.14109.

[12] GUGLIANDOLO E, D'AMICO R, CORDARO M, et al. Neuroprotective effect of artesunate in experimental model of traumatic brain injury [J]. Front Neurol, 2018, 9: 590. DOI: 10.3389/fneur.2018.00590. [PubMed]

[13] LIU Z, QU M, YU L, et al. Artesunate inhibits renal ischemia-reperfusion-mediated remote lung inflammation through attenuating ros-induced activation of NLRP3 inflammasome [J]. Inflammation, 2018, 41(4): 1546-1556.DOI: 10.1007/s10753-018-0801-z.

[14] ZHANG K, YANG Y, GE H, et al. Artesunate promotes the proliferation of neural stem/progenitor cells and alleviates Ischemia-reperfusion Injury through PI3K/Akt/FOXO-3a/p27kip1 signaling pathway [J]. Aging: Albany NY, 2020, 12(9): 8029-8048. DOI: 10.18632/aging.103121.

[15] EFFERTH T, OESCH F. The immunosuppressive activity of artemisinin-type drugs towards inflammatory and autoimmune diseases [J]. Med Res Rev, 2021, 41(6): 3023-3061. DOI: 10.1002/med.21842.

[16] ZHAO C, LIU Q, WANG K. Artesunate attenuates ACLT-induced osteoarthritis by suppressing osteoclastogenesis and aberrant angiogenesis [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 96: 410-416. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.10.018.

[17] QIN Y R, MA C Q, JIANG J H, et al. Artesunate restores mitochondrial fusion-fission dynamics and alleviates neuronal injury in Alzheimer's disease models [J]. J Neurochem, 2022, 162(3): 290-304. DOI: 10.1111/jnc.15620.

[18] ZHANG X, ZHANG Y, WANG F, et al. Necrosulfonamide alleviates acute brain injury of intracerebral hemorrhage via inhibiting inflammation and necroptosis [J]. Front Mol Neurosci, 2022, 15: 916249. DOI: 10.3389/fnmol.2022.916249.

[19] YANG F, WANG Z, ZHANG J H, et al. Receptor for advanced glycation end-product antagonist reduces blood-brain barrier damage after intracerebral hemorrhage [J]. Stroke, 2015, 46(5): 1328-1336. DOI: 10.1161/strokeaha.114.008336.

[20] ZUO S, GE H, LI Q, et al. Artesunate protected blood-brain barrier via sphingosine 1 phosphate receptor 1/phosphatidylinositol 3 kinase pathway after subarachnoid hemorrhage in rats [J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(2): 1213-1228. DOI: 10.1007/s12035-016-9732-6.

[21] LU H, WANG B, CUI N, et al. Artesunate suppresses oxidative and inflammatory processes by activating Nrf2 and ROS-dependent p38 MAPK and protects against cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(5): 6639-6646. DOI: 10.3892/mmr.2018.8666.

[22] CHEN Y L, WU J X, ZHU J, et al. Artesunate provides neuroprotection against cerebral ischemia-reperfusion injury via the TLR-4/NF-κB pathway in rats [J]. Biol Pharm Bull, 2021, 44(3): 350-356. DOI: 10.1248/bpb.b20-00604.

[23] MAMBWE B, NEO K, JAVANMARD KHAMENEH H, et al. Tyrosine dephosphorylation of ASC modulates the activation of the NLRP3 and AIM2 inflammasomes [J]. Front Immunol, 2019, 10: 1556. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01556.

[24] LIU F, ZHANG Y, SHI Y, et al. Ceramide induces pyroptosis through TXNIP/NLRP3/GSDMD pathway in HUVECs [J]. BMC Mol Cell Biol, 2022, 23(1): 54. DOI: 10.1186/s12860-022-00459-w.

[25] GU L, SUN M, LI R, et al. Activation of RKIP binding ASC attenuates neuronal pyroptosis and brain injury via caspase-1/GSDMD signaling pathway after intracerebral hemorrhage in mice [J]. Transl Stroke Res, 2022, 13(6): 1037-1054. DOI: 10.1007/s12975-022-01009-4.

[26] WANG D, SHI J, LV S, et al. Artesunate attenuates lipopolysaccharide-stimulated proinflammatory responses by suppressing TLR4, MyD88 expression, and NF-κB activation in microglial cells [J]. Inflammation, 2015, 38(5): 1925-1932. DOI: 10.1007/s10753-015-0172-7.

[27] FELBERG R A, GROTTA J C, SHIRZADI A L, et al. Cell death in experimental intracerebral hemorrhage: the "black hole" model of hemorrhagic damage [J]. Ann Neurol, 2002, 51(4): 517-524. DOI: 10.1002/ana.10160.

[28] KIM B J, LEE S H, RYU W S, et al. Extents of white matter lesions and increased intraventricular extension of intracerebral hemorrhage [J]. Crit Care Med, 2013, 41(5): 1325-1331. DOI: 10.1097/ccm.0b013e31827c05e9.

（收稿日期：2023-03-10；修回日期：2023-04-13）
（本文编辑：邹琳）